



**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/07855</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	18. Februar 1999 (18.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98 05127</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>11. August 1998 (11.08.98)</b>		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.          Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten:			
197 34 764.9      11. August 1997 (11.08.97)      DE 197 58 501.9      15. Oktober 1997 (15.10.97)      DE 60 078.386      18. März 1998 (18.03.98)      US			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>MEM-OREC STOFFEL GMBH [DE/DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE).</b>			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>STOFFEL, Wilhelm [DE/DE]; Kornelimünsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE); HOFMANN, Kay [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE); TOMIUK, Stephan [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE).</b>			
(74) Anwälte: <b>MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</b>			

(54) Title: **NEUTRAL SPHINGOMYELINASE**

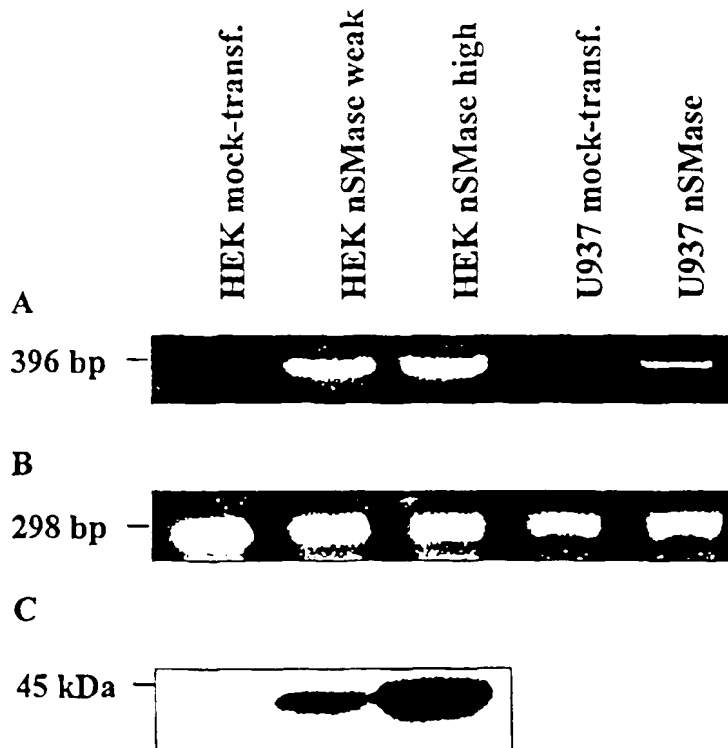
(54) Bezeichnung: **NEUTRALE SPHINGOMYELINASE**

(57) Abstract

The invention relates to eukaryotic neutral sphingomyelinase (nSMase) and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und seine Anwendung.



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Neutrale Sphingomyelinase

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren, und ihre Anwendung.

Sphingomyelin ist eine wesentliche Komponente von Plasmamembranen. Der Abbau des Sphingomyelins gibt eine Vielzahl von Substanzen, die potentielle second messenger Eigenschaften haben, z.B. Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat. Es sind zwei sphingomyelin-spaltende Enzymaktivitäten bekannt, zum einen die der lysosomalen sauren Sphingomyelinase und zum anderen die der plasmamembran-gebundenen neutralen Sphingomyelinase.

Die bakterielle neutrale Sphingomyelinase ist ein sezerniertes, lösliches Protein.

Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals Nukleinsäuren, codierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, verfügbar gemacht. Die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) ist dadurch charakterisiert, daß sie Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und die Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym. Die maximale Aktivität wird im neutralen pH-Bereich erzielt.

Figur 1 zeigt die Gensequenz der humanen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 2 zeigt die Gensequenz der murinen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse von Northern- und Westernblots nSMase-überexprimierender Zelllinien.

Figur 4 zeigt die Strategie zur Erzeugung von murinen Knockout-Mutanten. Die Buchstaben symbolisieren Restriktionsschnittstellen.

Figur 5 zeigt Konstrukte zur Gewinnung transgener Mausmutanten.

Bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäure um eine Nukleinsäure, die für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers codiert. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich dabei um die humane und murine neutrale Sphingomyelinase. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sind als Seq. ID. Nr. 3 und Seq. ID. Nr. 4 offenbart.

Teile der Nukleinsäuresequenzen stimmen mit der EST-Sequenzen AA028477 und AA013912 (murin) und W32352 und AA056024 (human) überein.

Bei Kenntnis der Aminosäure- und Nukleinsäurestruktur der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase kann der Fachmann unter Berücksichtigung der hohen Homologie zwischen der humanen und murinen nSMase die entsprechenden Nukleinsäuren und Proteine aus anderen Eukaryonten leicht auffinden. Dazu kann er zum einen kreuzreagierende Antikörper für eine spezifische affinitätschromatographische Aufreinigung einsetzen, oder er kann auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenz Oligonukleotidprimer synthetisieren und die gesuchten Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion in einer cDNA-Bank des Eukaryonten amplifizieren. Die entsprechende cDNA-Bank kann durch Isolierung von mRNA aus einer Gewebeprobe und anschließende Reverse-Transkription in an sich bekannter Weise erhalten werden. Aus der Nukleinsäuresequenz kann mit Hilfe des genetischen Codes die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Alternativ ist es hierzu auch möglich, homologe Sequenzen in EST (Expressed Sequence Tags)-Datenbanken zu suchen und zu kombinieren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in pro- oder eukaryontischen Systeme. Darüber hinaus sind sie auch zur Expression der nSMase in vivo im Sinne einer Gentherapie oder insbesondere in Form von Fragmenten auch in komplementärer Struktur als Antisense-Nukleotide zur Verringerung der Expression der nSMase geeignet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältliche eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.

Die erfindungsgemäße nSMase läßt sich durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen herstellen. Insbesondere sind eukaryontische Expressionssysteme geeignet. Entsprechende eukaryontische Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt wie beispielsweise pRc/CMV (Firma Stratagene). Die Aufreinigung aus gentechnisch veränderten Organismen bietet, insbesondere im Falle der Überexpression, einen leichten und direkten Zugang zur erfindungsgemäßen nSMase und erlaubt darüber hinaus die Isolierung in größeren Mengen.

Bevorzugt handelt es sich um die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere um humane oder murine neutrale Sphingomyelinase. Die Aminosäuresequenzen der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase sind als Seq. ID. Nr. 1 und 2 wiedergegeben.

Die Molekulargewichte der humanen bzw. murinen Sphingomyelinase beträgt 47,6 bzw. 47,5 kDa. Im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen enthalten die erfindungsgemäßen nSMasen von Säugetieren keine Signalsequenz am N-Terminus. Aufgrund der Hydrophobizität

tätsanalyse kann davon ausgegangen werden, daß zwei benachbarte hydrophobe Membrandomänen am C-Terminus durch acht Aminosäuren getrennt sind. Es scheint sich daher um integrale Membranproteine zu handeln, deren katalytisch aktive Domäne zum Cytosol zeigt, während nur ein geringer Anteil der Enzyme Kontakt zur extrazellulären Umgebung hat. Dies ist im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen, bei denen es sich um sekretierte, lösliche Proteine handelt, ist aber in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen zu den Eigenschaften der neutralen Sphingomyelinasen von Säugetieren. Die 1,7 kb mRNA der murinen nSMase wird gemäß Northern Blot Analyse in allen Geweben exprimiert. In Nieren, Hirn, Leber, Herz und Lunge zeigt der Northern Blot ein starkes Signal, während die Expression in der Milz gering zu sein scheint. Diese Messung war nicht in Übereinstimmung mit den gemessenen enzymatischen Aktivitäten der entsprechenden Gewebe. Dies spricht für eine posttranskriptionale Regulation der nSMase.

Das pH-Optimum der erfindungsgemäßen neutralen Sphingomyelinase liegt im Bereich von 6,5 bis 7,5 mit einem  $K_m$ -Wert für C18 Sphingomyelin im Bereich von  $1,0$  bis  $1,5 \times 10^{-5}$  M. Die Aktivität ist magnesiumionenabhängig, die Zugabe von EDTA führt zu einer Inhibierung der SMase-Aktivität, kann jedoch durch Zugabe von  $Mn^{2+}$ - oder  $Mg^{2+}$ -Ionen wiederhergestellt werden. Die Zugabe von 0,3 bis 0,5% Triton X-100 erhöht die Enzymaktivität. Die Aktivität ist unbeeinflusst durch Behandlung mit DTT oder 2-Mercaptoethanol, wohingegen die Zugabe von 20 mM Glutathion zur Inhibierung führte. Die Aktivität der nSMase ist nicht auf Sphingomyelin limitiert, auch das strukturell verwandte Phosphatidylcholin wurde mit etwa 3% Aktivität gespalten.

Weiterhin beansprucht werden Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase. Unter den Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) und an-

schließende Expression erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen. Dabei können sowohl Aminosäuren deletiert, eingefügt oder konservativ ausgetauscht werden. Konservativer Austausch bedeutet, daß eine Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wird, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist.

So sind beispielsweise folgende Aminosäuren austauschbar: Serin für/gegen Alanin, Alanin für/gegen Glycin, Methionin für/gegen Serin, Lysin für/gegen Arginin, Lysin für/gegen Serin.

Insbesondere umfaßt der Begriff Varianten auch N- und/oder C-terminale verkürzte Proteine sowie acetylierte, glykosylierte, amidierte und/oder phosphorylierte Derivate.

Die Aktivität der nSMase scheint zumindest zum Teil im C-terminalen Bereich zu liegen, da das Fragment 1 bis 282 der murinen nSMase bei Expression in HEK293 Zellen keine Erhöhung der Sphingomyelinase-Aktivität zeigte. C-terminale Fragmente der nSMase sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Auch Verbindungen, bei denen nSMase oder seine Varianten mit weiteren Molekülen wie Farbstoffe, Radionukliden oder Affinitätskomponenten gekoppelt sind, stellen erfindungsgemäße Varianten dar.

Beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren bzw. komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder um nukleaseresistenter Analoga handeln. Nukleaseresistente Analoga sind insbesondere solche Verbindungen, in denen die Phosphodiesterbindung durch hydrolysestabile Verbindungen modifiziert sind, beispielsweise Phosphothioate, Methylphosphonate o.ä.

Für Antisensenukleotide sind insbesondere kurze Fragmente der Nukleinsäuren geeignet. Diese sollten aus Gründen der Spezifität bevorzugt mehr als 6, noch mehr bevorzugt mehr als 8 und am

meisten bevorzugt mehr als 12 Nukleotide aufweisen. Aus Gründen der Diffusion und der Kosten haben sie üblicherweise eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden, bevorzugt 24 oder weniger und noch mehr bevorzugt 18 oder weniger Nukleotide.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von Nukleinsäuren, die für diagnostische oder therapeutische Zwecke mit anderen Molekülen gekoppelt sind, beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Markern oder Affinitätskomponenten, sowie Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und der zu diesen Nukleinsäuren komplementären Nukleinsäuren sowie Varianten der Nukleinsäuren.

Fragmente bezeichnet dabei Nukleinsäuren, die am 5' oder 3' oder an beiden Seiten verkürzt sind. Unter dem Begriff "Varianten" wird verstanden, daß diese Nukleinsäuren unter stringenten Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. dazu komplementären Nukleinsäuren hybridisieren. Unter dem Begriff "stringente Bedingungen" wird verstanden, daß die Hybridisierung bei Bedingungen durchgeführt wird, bei der die Temperatur noch bis zu 10°C unter der Temperatur liegt (bei sonst identischen Bedingungen), bei der exakt komplementäre Nukleinsäuren gerade noch hybridisieren würden. Wenn beispielsweise eine exakt hybridisierende Nukleinsäure unter gegebenen Bedingungen bis zu einer Temperatur von ca. 55°C hybridisiert, dann sind stringente Bedingungen Temperaturen gleich oder höher 45°C. Bevorzugt ist der Temperaturbereich für stringente Bedingungen von 5°C, noch mehr bevorzugt von 3°C.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen die erfindungsgemäße nSMase oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich insbesondere zum Einsatz in der Diagnostik, dem Fachmann an sich bekannten Immunoassays, zur histologischen Untersuchung sowie als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der nSMase verbunden sind. Solche erfindungsgemäßen Antikörper können mit dem Fachmann an sich bekannten Verfahren durch

Immunisierung mit nSMase, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Peptid- und Nukleinsäurenfragmenten in Gegenwart von Hilfsreagenzien erhalten werden.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Zelllinien, die die erfindungsgemäße nSMase überexprimieren. Solche Zelllinien sind erhältlich durch Transfektion mit Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für nSMase kodieren, enthalten. Im Falle von eukaryontischen Zelllinien kann die Transfektion beispielsweise durch Elektroporation erfolgen. Die Zelllinien sind dabei vorzugsweise stabiltransfiziert.

Überexpression bedeutet in diesem Zusammenhang, daß diese Zelllinie eine höhere Aktivität der nSMase aufweisen als die Zelllinien, die nicht mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfiziert wurden. Geeignete eukaryontische Zelllinien sind beispielsweise die Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat.

Die Zelllinien zeigten in Experimenten eine spezifische nSMase-Aktivität zwischen 0,3 und 10  $\mu\text{mol/mg}$  Protein/Stunde.

Figur 3 zeigt die Northern und Western Blot Analyse der nSMase-Expression in transfizierten Zelllinien. Teil A zeigt dabei das Ergebnis einer RT-PCR der Gesamtzelle RNA mit Primern, die mit humaner und muriner nSMase cDNA hybridisieren. Teil B zeigt als Kontrolle die T-PCR der Gesamt-RNA mit Primern, die zu humanem  $\beta$ -Actin cDNA hybridisieren. Teil C zeigt den Westernblot des Plasma Membran Proteinextrakts von verschiedenen HEK 293 Zelllinien nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit dem polyklonalen Anti-nSMase-Antikörpern.

Die Zugabe von 0,5 mM Arachidonsäure führte zu einer dreifachen Erhöhung der nSMase-Aktivität in den überexprimierenden HEK-Zellen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein transgenes Säugetier, das eine Überexpression (gain of function) oder eine Gendefi-

zienz bzw. einen Gendefekt (loss of function) für die erfindungsgemäße nSMase aufweist. Bevorzugt handelt es sich bei dem Säugetier um ein Nagetier, insbesondere eine Maus. Diese transgenen Säugetiere sind durch für den Fachmann an sich bekannte Verfahren erhältlich und eignen sich insbesondere zur Funktionsaufklärung der neutralen Sphingomyelinase. Für transgene Säugetiere werden definierte Genkonstrukte durch DNA-Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle im Einzellstadium injiziert, um die Expression des zusätzlichen Gens zu erreichen. Durch zielgerichtete Veränderung eines Gens im Genoms von ES-Zellen, die nachfolgend in Blastozysten injiziert werden, wird die Funktion eines Gens ausgeschaltet.

Die Strategie und Konstrukte zur Generierung der Mausmutanten sind in Figur 4 und 5 gezeigt.

Bevorzugt handelt es sich bei den transgenen Tieren um Tiere, bei denen das Gen zeitlich und gewebsspezifisch von außen induzierbar ein- bzw. ausgeschaltet werden kann. Entsprechende transgene Säugetiere eignen sich insbesondere zur Aufklärung der mit der erfindungsgemäßen nSMase im Zusammenhang stehenden Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen, die wiederum diagnostische oder therapeutische Anwendungen eröffnen. Insbesondere eignen sich die transgenen Säugetiere zum Screening von pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die erfindungsgemäße eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie die erfindungsgemäßen Antikörper können in Arzneimitteln und Diagnostikmitteln gegebenenfalls zusammen mit weiteren Hilfsstoffen enthalten sein. Diese Arznei- und Diagnostikmittel eignen sich zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

Insbesondere sind dies Erkrankungen, bei denen Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen und Stoffwechselstörungen eine Rolle spielen. Dies können beispielsweise Krebserkrankungen oder Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) sein.

Ein erfindungsgemäßes pharmazeutisches Screening-Verfahren beruht auf der Veränderung der Expression oder Aktivität der erfindungsgemäßen nSMase in nSMase-überexprimierenden Zelllinien bei Zugabe von mindestens einer potentiell pharmazeutisch wirksamen Substanz. Die Zelllinien eignen sich somit insbesondere zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden.

#### **Beispiel 1**

##### *Klonierung der Nukleinsäure*

Die erfindungsgemäßen für die neutrale Sphingomyelinase kodierenden Nukleinsäuren wurden in die NotI Schnittstellen der Klonierungsstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/CMV (Stratagene) kloniert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung mit einem Perkin-Elmer DNA-Sequenzer 377A erhalten.

#### **Beispiel 2**

##### *Klonierung der RNA*

Die Gesamt-RNA wurde nach bekannten Methoden aus verschiedenen Organen von acht drei Wochen alten CD1 Mäusen isoliert und Poly(A<sup>+</sup>)-RNA wurde durch Affinitätsreinigung an Oligo(dT)cellulose (Boehringer Mannheim Deutschland) gemäß Standardmethoden isoliert.

### Beispiel 3

#### Überexprimierende Zelllinien

U937 Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 1  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin/Streptomycin und 0,03% Glutamin bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ .  $5 \times 10^6$ -Zellen wurden mit 1  $\mu\text{g}$  linearisierter Plasmid-DNA, die für die erfindungsgemäße nSMase kodierte durch Elektroporation mit einem "gene pulser" (Firma Bio-Rad) transfiziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte unter 1 mg/ml Geneticin (G418, Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Die aus den Zelllinien aufgereinigte nSMase zeigte eine spezifische Aktivität zwischen 0,3 und 10  $\mu\text{mol/mg Protein/Stunde}$ . Das pH-Optimum lag bei 6,5 und 7,5. Der  $K_m$ -Wert für C18 Sphingomyelin betrug 1,0 bis  $1,5 \times 10^{-5}$  M. Die Aktivität war von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig; die Zugabe von EDTA inhibierte die Aktivität.

### Beispiel 4

#### Messung der nSMase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität wurde in Zellen und Mäusegewebe untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1.000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2.500 g gefolgt von einer Extraktion mit Lysepuffer mit 0,2% Triton X-100. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 100.000 g.

Gewebe von drei Wochen alten Mäusen wurde in kaltem Lysepuffer homogenisiert. Die zu untersuchende Menge an Protein oder homogenisiertem Gewebe wurde mit 10 nm (80.000 dpm)  $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]$ -Sphingomyelin für 30 min bei 37° in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  inkubiert. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  Wasser zugesetzt und unreaktiertes Substrat durch Extraktion mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) entfernt. Die Radioaktivität der wässrigen Phase, die

das enzymatisch freigesetzte Phosphocholin enthielt, wurde in einem Sintillationszähler gemessen.

#### **Beispiel 5**

##### *Polyklonale Antikörper*

Kaninchen wurden mit dem synthetischen Peptide CDPHSDKPFSDHE (entsprechend den Aminosäuren 261 bis 273 der murinen nSMase) gekoppelt an Keyhole-Limpit-Hemocyanin immunisiert. Das polyklonale Antikörperserum wurde durch Chromatographie an Hydroxyapatit und Affinitätschromatographie an einer Säule, an der das oben genannte synthetische Peptide gebunden war, gereinigt.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sie für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere für humane oder murine neutrale Sphingomyelinase kodiert.
3. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die neutrale Sphingomyelinase Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und ihre Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist.
4. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga handelt.
6. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 ist.
8. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase erhältlich durch Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 6, insbesondere mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2.

9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder

auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

17. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 durch chemische Peptidsynthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.
21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.
22. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.

23. Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8.
24. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.

## human neutral Sphingomyelinase (NSM) Gene Sequence

```

ACCGCGGCCGTCGCTGGAGAGTTTCGAGCCGCTAGCGCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TGGCGCCGGCAGCGACCTCTCAAGCTCGGCGGATCGCGGGGACCTCGAGGGGTGGTACT

AGCCCAACTTCTCCCTGCGACTGCGGATCTTCAACCTCAACTGCTGGTGAGTGCGTCTGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TCGGGTGAAGAGGGACGCTGACGCCTAGAAGTTGGAGTTGACGACCACTCACGCAGACG

GGAGTGCGGTCTGGGGGCCACCTTCCGTTGCGACCCATGCAGCCTTCCCTCCCCCTATCCC
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CCTCACGCCAGACCCCCGCTGGAAGGCAAGCGTGGGTACGTCGGAAGGAGGGGGATAGGG

GCCCCACGATCTCAGGGTGTAGGGAAACCCGACCTCCAAAGTCCACATCTGGCCCCAG
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGGGGTGCTAGAGTCCACATCCCTTTTGGGCTTGGAGGTTTCAGGTGTAGACCGGGGTC

CGCCGGTGGTCCCGAGCTCGCCTCCCTGCCCCGCTCTTCCCTTCCCTTAGGGGCAATCC
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GCGGCCACCAAGGTCGTCACCGGAGGGGACGCGGCGAGAAGGGAAGGAATCCCCGTAAGG

GTACTTGAGCAAGCACCGGGCCGACCGCATGAGCGCCTGGGAGACTTCTGAAACCAGGA
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CATGAACTCGTTCTGGCCCCGGCTGGCGTACTCGCGGACCTCTGAAAGACTTGGTCTCT

GAGCTTCGACCTGGCTTTGCTGGAGGAGGTGAGATTGTGCAGCACGGTGCGGAACCCAGG
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTCGAAGCTGGACCGAAACGACCTCCTCCACTCTAACACGTCGTGCCACGCCTTGGGTCC

CTGGGAGGAGGGACAGACCGTCCCACTGGGGAAAGACCAAGCAGGCATCCTCACCGCTTC
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GACCCCTCCTCCCTGTCTGGCAGGGTGACCCCTTTCTGGTTCGTCCGTAGGAGTGGCGAAG

CCTCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTGAGACAGAAGCTGTACCTACCTAC
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GGAGTCCACACCTCACTCGTCTGAAGGTGATGGACTCTGTCTTCGACAGTGGATGGATG

CCAGCTGCACACCACTTCCGGAGGTGAGAAGCCCACTGGCCTGAAGCCTGTTGTATCCC
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GGTCGACGTGTGGTGAAGGCCTCCACTCTTCGGGTGACCGGACTTCGGACAACAGTAGGG

AGGAGGCTCTTGGCCCTGCCAGCCCTTCCCTATCCTGCCTGCACTCTCCAGTCTCCTCCA
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TCCTCCGAGAACCAGGACGGTCGGGAAGGGATAGGACGGACGTGAGAGGTGAGAGGAGGT

GCCTCCTCTCCCTCTGGATGTGAGAGAAGGAGAAGGGTGAACCAAGAAGGTCTATGACT
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CGGAGGAGAGGGAGACCTACACTCTCTTCTTCCCACTTGGTTCTTCCAGGATACTGA

TCAGCCCATTTTCAGCTTTGTTTTCTGGCTGCCCTATACTCCTCCAAAGGCCGTCGCCTTG
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
AGTCGGGTAAAGTCGAAACAAAAGACCGGGATATGAGGAGGTTTCCGGCAGCGGAAC

GTTCTAGGGCTAGTCCCAGCAGTAGAAAAAGAAAAAATAGCTGATCAGAGCTGGAAGAC
781  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
CAAGATCCCGATCAGGGTCGTCTCTTTTCTTTTATCGACTAGTCTCGACCTTCTG

AAGGGAGGGGAAGAAGGCTGGGTGTCTCTCCCTCTTTTCTGGTTATTAAAGCAGGGCTTG
841  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
TTCCCTCCCTTCTTCCGACCCACAGAGGGACAAAAGACCAATATTCTCTCCCGAAC

```

Figur 1-1

2 / 10

1861 CTCTCCCTCCTTCTCCCTCCTATCCTAGCATGAGGCAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG 1920  
 GAGAGGGAGGAGAGAGGGGGTGTAGGATCCTACTCGSTTACTAAGGGGAATCCCGAGACTCC  
 AAGGCCAACACAATGCTACCCCAAGAACTGNTACGTCCAGCCAGCAGGAGGCTGAAGCCATTTC  
 1921 TCCCGTTGTGTTACCATGCGTTCTTGACNATGCASTCGGTCTCCTCGACTTCGGTAAAG 1980  
 CCTTGGGTGTCGGCATGACTACGTGCTTTACAAGGTGAGGCTCCTCCCTTCAACATGCT  
 1981 GGAAACCACAGGGCTAACTGATGCAAGAAATGTTTCAGTCCGAGGAGGGAGGTTGTACGA 2040  
 TTCATATGCTGTCTCTCTTTGTCTACTAACCTGTGTAGATCCTTTGCTCAGNTAGTCTAG  
 2041 AGTATACGACACAGAGAAACAGATGATTGACACATCTAGGAACGAGTCTCATCAGATC 2100  
 TCTTGGACCACTGATGGGTGGAAAGTGGGCTAGCCGCGAGGTGCTTCTCTGGGAAGAGGC  
 2101 AGAACTGTGTGACTACCCACCTTTCACTCCATGCGCCCTCGACCAAGAGACCTTCTCCG 2160  
 CTTCATATATAAGCTTCTCTCTGTTGGCTTACTTTTCTTAGGCACTTCTCTGGSTTTTACAT  
 2161 CGAGTATATATTGAGAGAGAAAGCGGAAATGAAAGGTTCTCTGAAAGACCCAAATGTA 2220  
 CTCCTGTAAAGATTTTGAAGCACTACAGGCTTTGAGCTTACAGGGGCGAGCCCCCTCTC  
 2221 GAGGACATTCTCAAAACTTTGCTGATGTCGAAACTGGGANTGTCCCCGTGGGGGGAGAG 2280  
 TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTTGTGAGGCACAGCCCCCACAGCAGAACC  
 2281 AACTAGTACTTCGGGACTACCGATGAGACAAACACTCCGTGTCCGGGGGTGTCGTCTTGG 2340  
 CCAGCTCTACCCACGGTGAGTCACCCCAACCTTTCTTGGCCCTTGCCCCGCTTGAAGC  
 2341 GGTGAGATGGGTGCCACTCAGTGGGGGTGGGAAAGGAACCGGAACGGGGCGAAGTTCG 2400  
 AGCCCTTCCACTCTTGACTCTCTCCTGCCCACTGCCCTGCTCTGTTGTAGGACCAGCAG  
 2401 TCGGGAAGGTGAGAACTGAGAGAGGACGGGCTGACGGGACGAGACAACATCCTGGTCTGTC 2460  
 AGAGGTGCGCGTTGATGTGTGTGCTAAAGGAGGCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGCATGG  
 2461 TCTCCAGCGCAACTACACACACGATTTCTCTCGGACCTGCCTCGACCCAGACCCGTACC 2520  
 CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCCTGGGGCTGCTTCTCC  
 2521 GAGTCCGAGCGACACCCCGGTGGAAGCGATCGATACACTAACCGGACCCCGACGAAGAGG 2580  
 TGGCACTGCTGTGTGTCTCTGGCGGCTGGAGGAGGGGCCGGGAAGCTGCCATACTGCTCT  
 2581 ACCGTGACGACACACAGGACCGCGACCTCTCCCCGGGCCCTTCGACGGTATGACGAGA 2640  
 GGACCCCCAGTGTAGGGCTGGTGTGTGGGSCAGGTGCATTCTACCTCTTCCACGTACAGG  
 2641 CCTGGGGGTACATCCCGACACGACACCCGTCCAGTAAGATGGAGAAGGTGCATGTCC 2700  
 AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCAGGCTGAGCTCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG  
 2701 TCCAGTTACCGAATATATCCCGGCTCGAATCGAGGCTGTACAGATCCTTCCCGTTCCC 2760  
 AGGCGCAGGATCTGGGCGCAGAGGCTCAGTCCAGGCTACTCTGGGSCAGCAGGAGGGGG  
 2761 TCCGGTCTAGACCCGGGTCTCGAGTCTGTCGGGTGAGGACCCCGTCTCTCTCCCC  
 ACAGAACTAAAGAACTAAAGCTTGGCCCA

E VIII

E IX

E X

3 / 12

2821 -----+-----+-----+--- 2852  
TGTCTTGATTCTTGTTATTTCTGAACCGGGTT

Figur 1-3

4 / 10

## Mouse Neutral Sphingomyelinase (nSMase) gene sequence

```

TNGAARCTGTTAGCTCCAGNCCGSTNGSTCGCCGTNCTAGNCINATCTNTATAGCTCTTC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ANCTRNAGACAATCGAGGTCNGGCCANCCAGCGGCANGATCNGNNTAGANATATCGAGAAG

GTTGCGAGCNCAATTRRNITCTCAATAAANGGATNCANCCCTATGACAGAACGTGGACCCC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAACGCTCGNGTTAANNRNAGAGTTATTTNCCTANSTNNGGATACTGTCTTGACCTGGGG

CGCCCGCCANNCANNGANACCCCGCATGGGNTGAGGTGCNCANGGTGTCTGSGGGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GCGGCGCGSTNGNGTNCNCTNTGGCGCCGTACCCNGACTCCACGNGTNCACAGACCCCGC

AAGGGTTACCTCAGCAGATGCTCTTTGACAGCTGAAAGCTGGAGCTTTTGAANAGCCCCAN
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TCCCCAATGGAGTCGCTACCCAGAACTGTGGACTTTGACCTCGAAAACCTTNTCGGSGTN

CACCTTCAGCTTCAGCGGGCGGCTGNGGGGCAACCGCACTGAAATGCTGGGGGCTTCCA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GTGGAAGTCGAAGTCCCCCGCGAGNCCGCGCTTGGCGTGCAGTNTACGACCCCCGAAGCT

CTTGGGGCGGCACGSGNTGCTGGGTGGCCATGAAANRNACAGNACAGAGCCCCGNACACAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GAACCCGCGCGTGCCNACGACCCACCGGTACCTTNRNTGTCTNTGTCTCGGGCCNTGTGTT

ATANTGCGAGTCGCCANGGNAACCGGTGGCTCCTCCCCGAACGCCCNCAGGGGCGGGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TATNACGCTCAGCGGTNCCNTTGGCGCACCGAGGAGGGGCTTGCGGGNGTTCGCCGCCCT

CCTGAGTGAGTTCTNTGGGCGGGGCTCNCATCAACTTCAAGCCTGTTGCTGGTGGAAGCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGACTCACTCAAGNACCCGCCCCGGAGNGTAGTTGAAGTTGCGACAACGACCACCTTCGG

GAGCCCGGAACAAGGGAGGAACCTGTAGGCCGCGGTGCGGATAACCCACCGAAGGACCTA
E I 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTCGGCCCTTGTTCCCTCCTTGGACATCCGGCGCCACGCGCTATTGGGTGGCTTCCTGGAT

AGAATCTGGAACAGTCCACCCGAGATTCTTCCAGGACTGCCGGCGGACTCTCGCATTCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCTTAGACCTTGTCAGGTGGGCTCTAAGGAAGGTCTGACGGCCGCTGAGAGCGTAAGT

GCCCCGGGATTTGCAGCCGACCTTCTTCCGGGTGGAATGACGGCCTTTGTCCCAGTAACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CGGGCCCTAAACGTCCGCTGGAAGAAAGGCCACCTTACTGCCGGAACAGGGTCATTGC

CAGGAGTCNNCCCCACCCCCAACCACTCGCGTTCCTGGGTGCGGGCAGCGCAGGATAGG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GTCCTCAGNNGGGGTGGGGGTGGTTCGAGCGCAAGGACCCAGCCCCGTGCGTCTATCC

GCAATAAGCCTGTGCGCGCAATCCGCTCGCCGCCCTTGTCTCGAAGCACTCCAGCCATG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGTTATTGCGACACGCGCTTAGGCGGAGCGGCGGGAACGAGGCTTCGTGAGGTGCGGTAC

AAGCTCAACTTTTCTCTACGGCTGAGAGTTTTCAATCTCAACTGCTGgtaagtaagtget
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TTCGAGTTSAAAAGAGATGCCGACTCTCAAAAGTTAGAGTTGACGACcattcattcaaga

```

5 / 12

```

cccaggcgctgggCTGCAGCCTCGGAGCCACCTTCCAGTCCCCTCTCGCACATGCCTAGGA
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
gggtccgcacccGACGTCGGAGCCTCGGTGGAAGGTCAGGGGAGAGCGTGTACGGATCCT

AGGAAGCAGGTCTTCTTCAGCCGAGCTAGACCCCTGTCCTTCCCGAACCACCAAAGTCCAC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
TCCTTCGTCCAGAAGAAGTCGGCTCGATCTGGGACAGGAAGGGCTTGGTGGTTTCAGGTG

ATCGCCTAAAGACCAGAGCTTGGGTGGTTGCAGCAATCACCAAAGTCCCTATCATCCAAA
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TAGCGGATTTCTGGTCTCGAACCCACCAACGTCGTTAGTGGTTTCAGGGATAGTAGGTTT

GCTGAGGTGATGACAGCAGTAATCGTCCCAAACCTGGCCCATGTCTTTCTTTTAAATGA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGACTCCACTACTGTCGTCAATTAGCAGGGTTTGGACCGGGTACAGAAAGGAAATTTACT

TTTACTTTTATTTTATGTACATTTGGTGTTTTGCCTGTATGTATGTCTGTGTGAAGGTGC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
AAATGAAAATAAAATACATGTAAACCACAAAACGGACATACATACAGACACACTTCCACG

CAGATTCTCTGGAACCTGGAGTTACAGACAGTTGTAAGCTGTCTATGTGCTTGCTGGAAATT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GTCTAAGAGACCTTGACCTCAATGTCTGTCAACATTTCGACAGTACACGAACGACCTTTAA

GAACTGCTGACCCATCTCTTCTGCCCCCTGCGTCTCCACCCCTTTTAGGGACATCCCCT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTTGACGACTGGGTAGAGAAGACGGGGGACGCAGGAGGTGGGGAAAATCCCTGTAGGGGA

ACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTTGGGAGACTTTCTGAACTTGAAAA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TGGACTCGTTTGTATCCCGCCTGGCGTACTTCGCGAACCCCTCTGAAAGACTTGAACCTTT

E II
ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGTAGGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAACTAGACCGAGAGGACCTCCTCCACTCCAACATCCCGTCCGATCCAACCTCCTCCC

CAGCAGGCGGCAGGCGGCGGCAGGAAAACTTGTTCTGTCTTGGGATGAAATCCCAAGCAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCGTCCGCCGTCCGCCGCCGTCTTTTGAACAAGACAGAACCCTACTTTAGGGTTTCGTT

GTATCCTCACCTTCTTCTCCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCCAGTACCTAAGGCAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CATAGGAGTGGAAGAAGGAGGTCCACACCTCACTCGTCTGAAGGGTCATGGATTCCGTT

E III
AGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTTCTC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCCGATAGCGAGTGGATAGGTCTACGTGTGATGAAGTCTTCCACTTTTCGGACACAAGAG

AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCTCCAACATTCTTGCTTGCAACCCTCGATCTTCTTCC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TCGGACAAGAGTCTGCTCCTTCGAGAGGTTGTAAGAACGAACGTGGGAGCTAGAAGAAGG

TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTCACCCTCATCTTGCAAGGGCTGCTGTCTTAGGCTT
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AGACCCACACTCTTCTCGTCCGGCAGTGGGAGTAGAACGTTCCCGACGACAGAATCCGAA

TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ACAAGACCCCACTAGAAATCGTCATCTCGACCCTCTGGCGCCTCCCCTTCTCCCGACCGA

```

Figur 2-2

6 / 12

1741 GGGTACTCCCTCTCTTCTCTCTGTTATTAAAGCAAGASTTGSTTTTCAGCGGGATGAT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
 CCCATGAGGGGAGGAACGAGAAGACCAATTAATTCGTTCTCAACCAAAAGTCGCCCTACTA  
 E IV  
 1801 AGGCAGTGGCCTCTGTGTGTTCTCCAAACACCCCAATCCAGGAAATCTTCCAGCATGTCTA  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860  
 TCCGTCACCGGAGACACACAAGAGGTTTGTGGGTTAGGTCCCTTTAGAAGGTCGTACAGAT  
 1861 CAGTCTGAATGGTTACCCCTACATGGTAAGSATCTCTTCCCTATCCTTGCTAACACAGAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920  
 GTCAGACTTACCAATGGGGATGTACCATTCCTAGAGAAGGSATAGGAACGATTGTGTCTG  
 1921 TGGACGACGCTTCTCTGGGGCCTTGSCAGSAGGGTGTCACTACCCCTGAGTTTTTCTCTTC  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980  
 ACCTGCGTCCGAAGGACCCCGGAACCGTCTCTCCACAGTCATGGGACTCMAAAACAGAAAG  
 1981 TCTTGCCTGCAGTTCCATCATGGAGACTGTTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGGCTGCTGGTG  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040  
 AGAACGGAAGTCAAGGTAGTACCTCTGACCAAGACACCCTTCAGACACCCCGACGACCCAC  
 E V  
 2041 CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGTCTCAATGCCTACGTGACTCATGTGAGTGGGGCTAGCCAG  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100  
 GAGGCAGATTACCTGACCAAGGATTACGGATGCACTGAGTACACTCAGCCCGATCGGTC  
 2101 GCTTAGGCAGTGGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160  
 CGAATCCGTCACCCAGTTCTGTCGGGTTACGATACCACCTCTTCTCTGCGGTGATCAATCA  
 2161 TCTGCTGCCTGGGGATAAGGCATGGGATCAGAAGCTAGCATTGGGGCAAGGTTACCCCAT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220  
 AGACGACGGACCCCTATTCCGTACCCTAGTCTTCGATCGTAACCCGTTCCAAGTGGGTAA  
 2221 CCCTGTCACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTGAGACAGCCTTCTCTTTGA  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280  
 GGGACAGTGTGAGACGGTACACTGTCTACTGTTCCGAACCTAAGTCTGTCCGAAGAGAACT  
 2281 TTTCACCTATTCCACTTTAGCTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTG  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340  
 AAAGTGGATAAGGTGAAATCGATGTACGACTCATGTGCGGTGTCTTCTCTGTAGATGAAAC  
 E VI  
 2341 CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAAGTGGCCCAAGTTTCATCCAGTGTGTGAGCCTGGGCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400  
 GTGTGGCACACCGGGTTTGAACCCCTTGACCGGGTCAAGTAGGTCAACACTCGGACCCGA  
 2401 TGATGGGGCTGTGGGGTGGGGACGGGGTTGAGGGATGNGNAATTTATCCTTGAAGAGGG  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460  
 ACTACCCCGACACCCACCCCTGCCCAACTCCCTACNCTTAAATAGSAACTTCTCCC  
 2461 CACATAATAAGGGAAGAATTTCTCTCTGCGGCTCTTCCCCCAACTCAGCCACACATCCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520  
 GTGTATTATTCCCTTCTTAAAGGAGGAACGGCGAGAAGGGGTTGAGTCGGTGTGTAGGT  
 E VII  
 2521 AGAATGCAGATGTGTTTCTATTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAGACCTGGGCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2580  
 TCTTACGTCTACACCAAGATAACACACCTCTGGAGTTATACGTGGGGTTTCTGGACCCGA

Figur 2-3

7 / 12

GCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGGGCTCCATGATGCTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTA  
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640  
CGACGGACGACTTTCTCACCTGTCCCAGGGTACTACGAAAGCAACTCTGACTCCTGAAAT  
AGGTGAGAGACTGTTTCCCACCAACTCCACACTTGTTCAGTCTTCCTGTCTCTTAGCAT  
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700  
TCCACTCTCTGACAAAGGGTGGTTGAGGTGTGAACAAGGTGAGAAGGACAGAGAATCGTA  
CCTAGCCACCTGTTTCCCTAGGGCTCTGATGATGGCTGTACCATGGTACCCAGAAGTGC  
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760  
GGATCGGTGGACAAAGGGATCCCGAGACTACTACCGACATGGTACCATGGGTTCTTGACG

## E VIII

TACGTCAGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTCCGTCTGGTATCCGGATTGATTACGTGCTT  
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820  
ATGCAGTCGGTCGTCTGGACCCCTGGCAAAGGCAGACCATAGGCCCTAACTAATGCACGAA  
TACAAGGTCAGGCTCTTATTCCCGGTGTGCTTCTCCAGTATCTTCTTCTCTGTCACT  
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880  
ATGTTCCAGTCCGAGAATAAGGGCCACACGGAAAGAGGTCTAGAAAGGAAGGAGACAGTGA  
AGCCACGCTTTAGTTCAGCTACAGTCTTGGGCCACTGATGGCTAAAGAATAGAATCCTG  
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940  
TCGGGTGCGAAATCAAGTCGATGTCAGAACCCGGTGACTACCGATTCTTATCTTAGGAC  
TCGGCTGGTTCTCTGGGAGAAATTAAGCTTCTCCATGTTCTTGCTCTTCTTAGGACGTCT  
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000  
AGCCGACCAAGAGACCCCTCTTAAATTGAGAGGTACAAGAACGAGAAGGATCCGTCAGA  
CTGAGTTCCACGTCTGCTGTGAGACTCTGAAAACCACTACAGGCTGTGACCCTCACAGTG  
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060  
GACTCAAGGTGCAGACGACACTCTGAGACTTTTGGTGATGTCCGACACTGGGAGTGTAC

## E IX

ACAAGCCCTTCTCTGATCAGAGGCCCTCATGGCTACTTTGTATGTGAAGCACAGCCCCC  
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120  
TGTTGCGGAAGAGACTAGTGTCTCCGGGAGTACCGATGAAACATACACTTCGTGTGCGGGG  
CTCAGGAAGACCCCTGACTGCCTGTGTAAGCAGCATTTCTTTGCCCCCTCTACTTTA  
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180  
GAGTCCTTCTGGGGACATGACGGACACCATTTCGTCTGTAAGGAAACGGGGGAGATGAAAT  
AGGCAGCCCCGCTCCATCCTGACCCTCCCTGCTCTACGTTCTCTCTTTTCCAGGCCC  
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240  
TCCGTGCGGGCGGAGGTAGGACTGGGAGGGGACGAGATGCAAGAGAGAAAAAGGTCCGGG  
ACTGGAAGGTCCGATTTGATCAGCGTGCTAAGGGAGGCCAGGACAGAGCTGGGGCTAGG  
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300  
TGACCTTTCCAGGCTAAACTAGTCGCACGATTCCCTCCGTCCTGTCTCGACCCCGATCC

## E X

CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGGCTGTC  
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360  
GTATCGATTTTCGAGCGACCACCCGACGTAAGAGACCGATACACTAGCAAAACCCCGACAG  
CCTTCTGGTGTGCTGTGTGCTCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT  
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420  
GGAAGACCACAACGACACACAGGACCGACGTCCTCTTCTCCGGTCCCTTCACCGGTAGTA

Figur 2-4

8 / 12

```

CCTCTGCATACCCAGTGTGGGTCTGGTGCTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTCTTCCACAA
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
GGAGACGTATGGGTACACCCAGACCACGACCATCGTCCACGTCAGATGGAGAAGGTGTT

GCAGGAGGCCAAGGGCTTATGTGGGCCCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CGTCCTCCGGTTCCTGAATACAGCCCGGGTCCGACTCTACGACGTGCAAGACTGTTCCCTT

AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCACCTAGCCTACTGCTTGCAGCAGGAGGG
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
TTGCCTCTGGGTCTCTGGCTCCGAGTCTCGGAGTGGATCGGATGACGAACGTCGTCCTCCC
stop
GGACAGAGCTTAAGAGCTTAACAATAAACTTGCTTGACACACTCTAGTGGCTCTACCTT
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
CCTGTCTCGAATTCTCGAATTGTTATTTTGAACGAACGTGTGTGAGATCACCGAGATGGAA

GTTCCCTTGCAGAGGCATGATGGGAAGTCAAGSTCAAGTGGCCTTGTCAGTGTGTGGCTTTA
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
CAAGGAACGTCTCCGTACTACCCCTTGACTTCCAGTCAACGGGAACAGTGACACACCGAAAT

GAGGGTTGGCTCTCAGTTGCTTTTTCGACACTCCGCTCTCCTGCCAGCAGAGCAT
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
CTCCCAACCGGAGAGTGAACGGGAACAGCTGTGAGGGCAGAGGACGGTCTGTCTCTCGTA

AAACCCCTGTTTCATGGTCAATAATCCTTTTATTGTAAACAACGAAGCCTCTGACTAAGCAGT
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
TTTGGGACAAGTACCAGTATTAGGAAAATAACATTTGTTGCTTCGGAGACTGATTCTGTCA

CCAGATGGCGGAGGTACAGCCCTTGTGATGGTGTCTTGCTTACGGGGCAGGGAGGCAGCT
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
GGTCTACCGCCTCCATGTCCGGGAACACTACCACAGAACGAATGCCCGTCCCTCCGTCTGA

AACCATCATCTTCTAGCCCTGGGCTCCCATCTATGCAGGCATCTCTCTGAGCCTCCGTTT
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
TTGGTAGTAGAAGATCGGGACCCGAGGGTAGATACGTCCGTAGAGAGACTCGGAGGCAAG

CTCCTGGAATTGGNTCAGAGCAATCCCGCTTGGTTACCAACCTCCAAACAGCTTCCTTA
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
CAGGACCTTAACCNAGTCTCGTTAGGGCGAACCAGTGGTTGGAGGTTTGTCTGAAGGAAT

AGGACCTGGTTTCTCAAAANGGNAAGGTNCGGGCCTCCGGTCTTCAATANGTTTTCTTAA
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
TCCTGGACCAAAAGAGTTTTCNCTTCCANGCCCGGAGGCCAGAAGTTATNCAAAAGGATT

AAAGGGANGAATGAAAANCCTTAAGNCCAACAAGGGGAACCCCTTGGNCCCAAAAGGGGA
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
TTTCCCTNCTTACTTTTNGGAATTCNNGGTTGTTCCCTTGGGAACCGGGTTTTTCCCTT

CCTGGGTGGTTTCCCNCTTGGGGCCAAANTTATCCCAAAGGGGTCCAATTGAAGGGTTAAC
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
GGACCCACCAAAAGGGNAACCCCGSTTTNAATAGGGTTTCCCCAGGTAACTTCCCAATTG

CCCCCAAAAANNACCCNTTTCCCGCGGAATTTCCAAAGGTTTNCACCCCGGSCAAAANC
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
GGGGSTTTTTNTGSGNAAGGGGSCCTTAAAGSTTTCCAAANGGGGGGGGGCTTTTTNG

```

Figure 2-5

9 / 12

```
TCCCTTGGGGNCCNAANCCNTGGCCCGGNCCTGGCTTTCCCCCTTTCCCAAGNATTC
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
AGGGAACCCCHNGGNTTNGGNACCGGGCCNGAACCGAAAAGGGGAAAGGGTTCNTAAAG

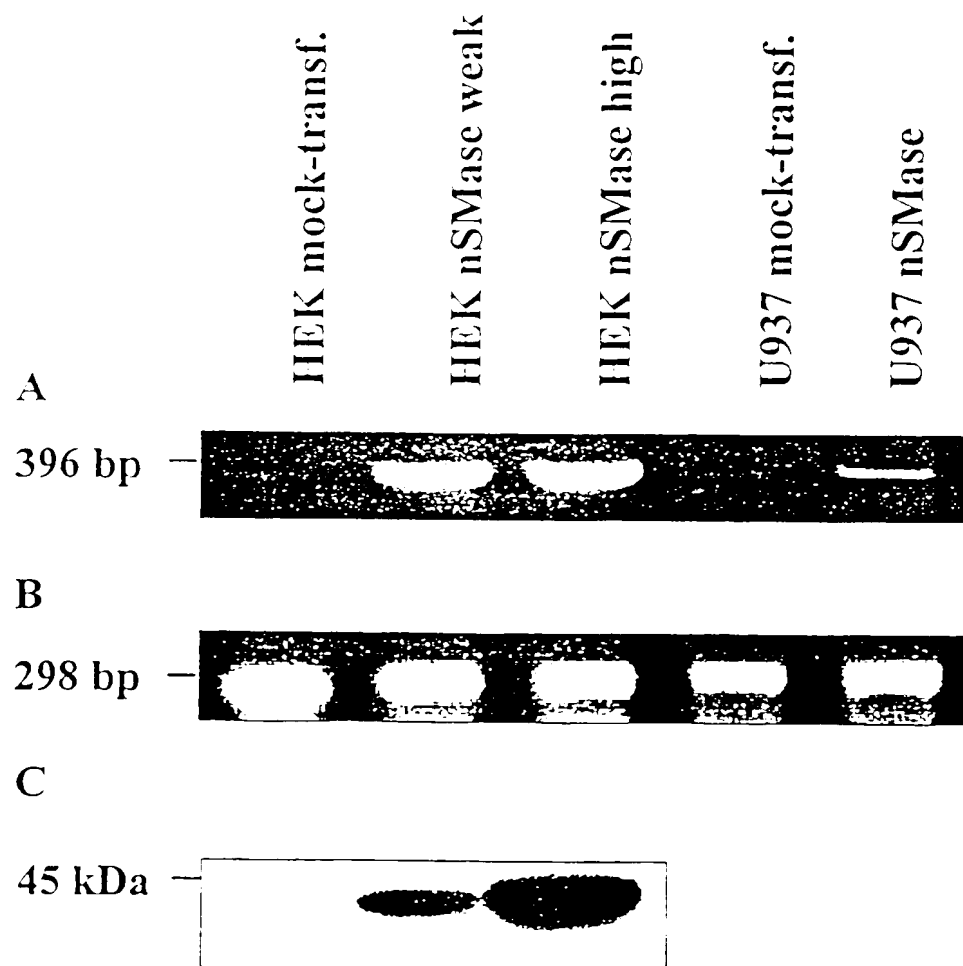
AAANNTTCCCTNGGAAANCCCTTGNTTGGNAAAACCAATNANGAACCAANGCCAANNT
4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380
TTTNNAAGGGANCCTTTNGGGGAACNAACCNTTTTGGNTTANTNCTTGGTNCGGTTNNA

TGCCAANAAACCNTTTGGGCAAAGGGGGNAAATTCANCAANGGGGNAATTGGGGAAACCC
4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440
ACGGTTNTTTGGNAAACCCGTTTCCCCNTTTAAGTNGTTNCCCNTTAACCCCTTTGGG

NTGGGTTTNCCTAAAGGGCCCAANANT
4441 -----+-----+-----+-----+-----+ 4468
NACCCAAANGGGTTTCCCGGGTTTNTNA
```

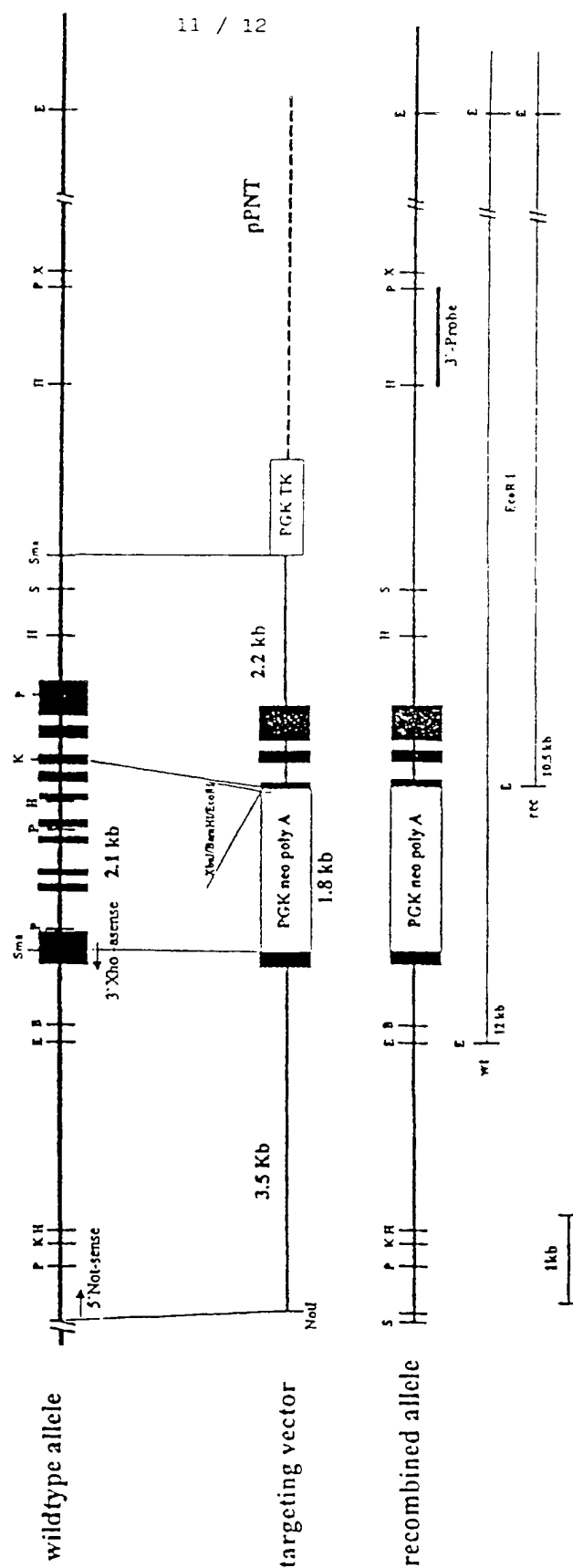
Figur 2-6

10/12



Figur 3

# mnSMase "konventional" Knock Out



Figur 4

## Konstrukte zur Generierung transgener Mausmutanten

Ubiquitinpromotor	nSMase	IRES	lacZ	polyA

polyA	rtTA	CMV	CMV-1	nSMase	IRES	GFP	polyA

Ubiquitinpromotor: Regulationssequenz des Ubiquitin-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

nSMase: neutrale Sphingomyelinase

lacZ: lacZ, Gen kodiert für die  $\beta$ -Galaktosidase

polyA: Erkennungssignal für die Termination der Transkription und Polyadenylierung

CMV: Cytomegalovirus-Promotor des Cytomegalovirus-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

rtTA: reverser Transaktivator, bindet an den Minimalpromotor und steuert dadurch die Transkription. Die Bindungseigenschaften des Transaktivators werden durch Tetrazyklin beeinflusst. Zugabe von Tetrazyklin läßt den Transaktivator an den Minimalpromotor binden und startet die Transkription, Wegnahme von Tetrazyklin verhindert die Bindung des Transaktivators an den Minimalpromotor und verhindert die Transkription.

CMV-1: Minimalpromotor, Bindung des Transaktivators startet die Transkription.

IRES: internal ribosomal entry sequence, virales Initiationssignal für die Translation.

Figur 5

## SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Memorec Stoffel GmbH  
(B) STRASSE: Stoeckheimer Weg 1  
(C) ORT: Koeln  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 50829

## (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neutrale Sphingomyelinase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 423 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Ile Phe Asn Leu Asn Cys  
1 5 10 15

Trp Gly Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Arg Arg  
20 25 30

Leu Gly Asp Phe Leu Asn Gln Glu Ser Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu  
35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Lys Leu Ser  
50 55 60

Pro Thr Tyr Pro Ala Ala His His Phe Arg Ser Gly Ile Ile Gly Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Leu Thr Gln His  
85 90 95

Ile Tyr Thr Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Ile His His Gly Asp Trp  
100 105 110

Phe Ser Gly Lys Ala Val Gly Leu Leu Val Leu His Leu Ser Gly Met  
115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Asn Arg Gln  
130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Leu Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala  
145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Lys Ala Asp Val Val Leu Leu Cys  
165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Glu Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys  
180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Tyr Leu Glu Thr Arg Asp Phe Lys  
195 200 205

Gly Ser Glu Glu Gly Asn Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser  
210 215 220

Gln Gln Glu Leu Lys Pro Phe Pro Phe Gly Val Arg Ile Asp Tyr Val  
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Cys Lys Ser Phe Glu  
245 250 255

Thr Thr Thr Gly Phe Asp Pro His Ser Gly Thr Pro Leu Ser Asp His  
260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Phe Val Arg His Ser Pro Pro Gln Gln  
275 280 285

Asn Pro Ser Ser Thr His Gly Pro Ala Glu Arg Ser Pro Leu Met Cys  
290 295 300

Val Leu Lys Glu Ala Trp Thr Glu Leu Gly Leu Gly Met Ala Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Trp Trp Ala Thr Phe Ala Ser Tyr Val Ile Gly Leu Gly Leu Leu  
 325 330 335  
 Leu Leu Ala Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Glu  
 340 345 350  
 Ala Ala Ile Leu Leu Trp Thr Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Trp Ala  
 355 360 365  
 Gly Ala Phe Tyr Leu Phe His Val Gln Glu Val Asn Gly Leu Tyr Arg  
 370 375 380  
 Ala Gln Ala Glu Leu Gln His Val Leu Gly Arg Ala Arg Glu Ala Gln  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Gly Pro Glu Pro Gln Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gln Gln Glu  
 405 410 415  
 Gly Asp Arg Thr Lys Glu Gln  
 420

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 419 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Val Phe Asn Leu Asn Cys  
 1 5 10 15  
 Trp Asp Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Lys Arg  
 20 25 30  
 Leu Gly Asp Phe Leu Asn Leu Glu Asn Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu  
 35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Arg Leu Ser  
 50 55 60

Leu Thr Tyr Pro Asp Ala His Tyr Phe Arg Ser Gly Met Ile Gly Ser  
 65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Ile Phe Gln His  
 85 90 95

Val Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Phe His His Gly Asp Trp  
 100 105 110

Phe Cys Gly Lys Ser Val Gly Leu Leu Val Leu Arg Leu Ser Gly Leu  
 115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Ser Arg Gln  
 130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Phe Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala  
 145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Asn Ala Asp Val Val Leu Leu Cys  
 165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Lys Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys  
 180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Phe Val Glu Thr Glu Asp Phe Lys  
 195 200 205

Gly Ser Asp Asp Gly Cys Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser  
 210 215 220

Gln Gln Asp Leu Gly Pro Phe Pro Ser Gly Ile Arg Ile Asp Tyr Val  
 225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Glu Phe His Val Cys Cys Glu Thr Leu Lys  
 245 250 255

Thr Thr Thr Gly Cys Asp Pro His Ser Asp Lys Pro Phe Ser Asp His  
 260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Tyr Val Lys His Ser Pro Pro Gln Glu  
 275 280 285

Asp Pro Cys Thr Ala Cys Gly Pro Leu Glu Arg Ser Asp Leu Ile Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Arg Glu Ala Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gly Ile Ala Lys Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Trp Trp Ala Ala Phe Ser Gly Tyr Val Ile Val Trp Gly Leu Ser  
 325 330 335  
 Leu Leu Val Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Glu Glu Ala Arg Glu  
 340 345 350  
 Val Ala Ile Ile Leu Cys Ile Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Val Ala  
 355 360 365  
 Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Lys Gln Glu Ala Lys Gly Leu Cys Arg  
 370 375 380  
 Ala Gln Ala Glu Met Leu His Val Leu Thr Arg Glu Thr Glu Thr Gln  
 385 390 395 400  
 Asp Arg Gly Ser Glu Pro His Leu Ala Tyr Cys Leu Gln Gln Glu Gly  
 405 410 415  
 Asp Arg Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1662 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCGGCCGCGA CCGCCGGGGA CGAGCTTGGA GGAAAAGGAA CCGGGAGCCG CCCACCCGGG 60  
 GGCGCTCTCC GGACCCCCAG GGTCTAGCG CGCGGCCCTT ACCGAGCCTG GGCGCCCGGA 120  
 TTTCGGSAGC GGATCGCCTT TCCGGGTTGG CGGCCCGCCT GATTGGGAAC AGCCGGCCGG 180

TTGCCGGGGG AACGCGGGAG TCGGGTCCGA CCTGAGCCAC GCGGGCTTGS TSCCCACCTG	240
TGCGCGCCGC CTGCGAAGAA GGAACGGTCT AGGGAGAAGG CGCCGCCGGC CGCCCCCGTC	300
CCCACCGCGG CCGTCGCTGG AGAGTTGAG CCGCCTAGCG CCCCTGAGC TCCCCAACCA	360
TGAAGCTCAA CTTCTCCCTG CGACTGCGGA TCTTCAACCT CAACTGCTGG GGCATTCCGT	420
ACTTGAGCAA GCACCGGGCC GACCGCATGA GCGCGCTGGG AGACTTTCTG AACCAGGAGA	480
GCTTCGACCT GCCTTTGCTG GAGGAGGTGT GGASTGAGCA GGACTTCCAG TACCTGAGAC	540
AGAAGCTGTC ACCTACCTAC CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGCGGAATC ATTGGCAGTG	600
GCCTCTGTGT CTTCTCCAAA CATCCATCC AGSAGCTTAC CCAGCACATC TACACTCTCA	660
ATGGCTACCC CTACATGATC CATCATGGTG ACTGGTTCAG TGGGAAGGCT GTGGGGCTGC	720
TGGTGCTCCA TCTAAGTGGC ATGGTGCTCA ACGCCTATGT GACCCATCTC CATGCCGAAT	780
ACAATCGACA GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTTGG CCAAGCTTGG GAATTGGCCC	840
AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAAGGCAG ACGTGTTTCT GTTGTGTGGA GACCTCAACA	900
TGCACCCAGA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGGAGTG GACAGGGCTT CATGATGCCT	960
ATCTTGAAAC TCGGGACTTC AAGGGCTCTG AGGAAGGCAA CACAATGGTA CCCAAGAACT	1020
GCTACGTCAG CCAGCAGGAG CTGAAGCCAT TTCCCTTTGG TGTCCGCATT GACTACGTGC	1080
TTTACAAGGC AGTTTCTGGG TTTTACATCT CCTGTAAGAG TTTTGAAACC ACTACAGGCT	1140
TTGACCCTCA CAGTGGCACC CCCCTCTCTG ATCATGAAGC CCTGATGGCT ACTCTGTTTG	1200
TGAGGCACAG CCCCCACAG CAGAACCCCA GCTCTACCCA CGGACCAGCA GAGAGGTCGC	1260
CGTTGATGTG TGTGCTAAAG GAGGCCTGGA CGGAGCTGGG TCTGGGCATG GCTCAGGCTC	1320
GCTGGTGGGC CACCTTCGCT AGCTATGTGA TTGGCCTGGG GCTGCTTCTC CTGGCACTGC	1380
TGTTGTCTCT GCGGCTGGA GGAGGGGCGG GSGAAGCTGC CATACTGCTC TGGACCCCCA	1440
GTGTAGGGCT GGTGCTGTGG GCAGGTGCAT TCTACCTCTT CCACGTACAG GAGGTCAATG	1500

GCTTATATAG GGCCCAGGCT GAGCTCCAGC ATGTGCTAGG AAGGGCAAGG GAGGCCCAGG 1560  
ATCTGGGCCC AGAGCCTCAG CCAGCCCTAC TCCTGGGGCA GCAGGAGGGG GACAGAACTA 1620  
AAGAACAATA AAGCTTGGCC CTTTAAAAAA ·AAAAAAAAAA AA 1662

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1627 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGCTGGTGG AAGCCGAGCC GGAACAAGG GAGGAACCTG TAGGCCGCGG TGCGAGAACC 60  
CACCGAAGAC CTAAGAATCT GGAACAGTCC ACCCGAGATT CCTTCCAGGA CTGCCGGCGG 120  
CTCGCGCACC AGCCCGGGAT TTGCAGCCGA CCTTCTTTCC GGGTGGAAGG ACGGCCTTTG 180  
TCCCAGTAAC GCAGGAGTCG CCCCCACCC CCAACCAGCT CGCGTTCCTG GGTCCGGGCA 240  
GCGCAGGACA GGGCAATAAG CCTGTGCGCG CAATCCGCCT CGCCGCCCTT GCTCCGAAGC 300  
ACTCCAGCCA TGAAGCTCAA CTTTTCTCTA CGGCTGAGAG TTTTCAATCT CAACTGCTGG 360  
GACATCCCCT ACCTGAGCAA ACATAGGGCG GACCGCATGA AGCGTTGGG AGACTTTCTG 420  
AACTTGAAA ACTTTGATCT GGCTCTCCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGA CTTCAG 480  
TACCTAAGGC AAAGGCTATC GCTCACCTAT CCAGATGCAC ACTACTTCAG AAGCGGGATG 540  
ATAGGCAGTG GCCTCTGTGT GTTCTCCAAA CACCCAATCC AGGAAATCTT CCAGCATGTC 600  
TACAGTCTGA ATGGTTACCC CTACATGTTT CATCATGGAG ACTGGTTCTG TGGGAAGTCT 660  
GTGGGGCTGC TGGTGCTCCG TCTAAGTGGA CTGGTGCTCA ATGCCTACGT GACTCATCTA 720  
CATGCTGAGT ACAGCCGACA GAAGGACATC TACTTTGCAC ACCGTGTGGC CCAAGCTTGG 780

GAAGTGGCCC AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAATGCAG ATGTGGTTCT ATTGTGTGGA	840
GACCTCAATA TGCACCCCAA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGAGTG GACAGGGCTC	900
CATGATGCTT TCGTTGAGAC TGAGGACTTT AAGGGCTCTG ATGATGGCTG TACCATGGTA	960
CCCAAGAACT GCTACGTCAG CCAGCAGGAC CTGGGACCGT TTCCGTCTGG TATCCGGATT	1020
GATTACGTGC TTTACAAGGC AGTCTCTGAG TTCCACGTCT GCTGTGAGAC TCTGAAAACC	1080
ACTACAGGCT GTGACCCTCA CAGTGACAAG CCCTTCTCTG ATCACGAGGC CCTCATGGCT	1140
ACTTTGTATG TGAAGCACAG CCCCCCTCAG GAAGACCCCT GTACTGCCTG TGGCCCACTG	1200
GAAAGSTCCG ATTTGATCAG CBTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA	1260
GCTAAGCTC GCTGGTGSGC TBCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT	1320
CTGGTGTTC TGTGTGTCCT G3CTGCAGGA GAAGAGGCCA G3GAAGTGGC CATCATCCTC	1380
TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG	1440
GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCCAAGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG	1500
GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC	1560
AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAACTTGC TTGACACACA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1620
AAAAAAA	1627

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4464 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACTCGATCC CCGCGAACGC TCGCTCGCGC TCCGAGTCTC TTCCAGGTCT CCCTTCCTTG	60
---	----

CGACCAGCAT TTGTTCTCTA TGCCCCATC CAGCCCTAGG ACAGAACGTG GACCCCCGCC	120
CGCCAGCGCA GGCGACACCG CGGCAGGGGG CTGAGGTGCG CACGGCGTCT GGGGCGAGGG	180
GTTACCTCAG CGATGGTCTT TGACACCTGA AAGCTGGAGC TTTTGAAGAG CCCACCACC	240
TTCAGCTTCA GGGGCGGCTC GGGCGGCAAC CGCACGTGAC ATGCTGGGGG CTTCGACTTG	300
GGCCGGCAG GCTGCTGGGT GGCCATGGCA GGGACAGCAG AGAGCCCGGA ACACAAATAG	360
TGCGAGTCGC CAGGGCAACC GCGTGGCTCC TCCCCGAACG CCCGCAAGGG GCGGGACCTG	420
AGTGAGTTCG TGGGCGGGGC CTCGCATCAA CTTCAAGCCT GTTGCTGGTG GAAGCCGAGC	480
CGGGAACAAG GGAGGAACCT GTAGGCCGCG GTGCGGATAA CCCACCGAAG GACCTAAGAA	540
TCTGGAACAG TCCACCCGAG ATTCCCTCCA GGAAGTCCCG CGGACTCTCG CATTAGCCC	600
GGGATTTGCA GCCGACCTTC TTTCCGGGTG GAATGACGGC CTTTGTCCCA GTAACGCAGG	660
AGTAGCCCC CACCCCCAAC CAGCTCGCGT TCCTGGGTCTG GGCAGCGCA GGATAGGGCA	720
ATAAGCCTGT GCGCGCAATC CGCCTCGCCG CCCTTGCTCC GAAGCACTCC AGCCATGAAG	780
CTCAACTTTT CTCTACGGCT GAGAGTTTTT AATCTCAACT GCTGGTAAGT AAGTGCTCCC	840
AGGCGTGGGC TGCAGCCTCG GAGCCACCTT CCAGTCCCCT CTCGCACATG CCTAGGAAGG	900
AAGCAGGTCT TCTTCAGCCG AGCTAGACCC TGTCCTTCCC GAACCACCAA AGTCCACATC	960
GCCTAAAGAC CAGAGCTTGG GTGGTTGCAG CAATCACCAA AGTCCCTATC ATCCAAAGCT	1020
GAGGTGATGA CAGCAGTAAT CGTCCCAAAC CTGGCCCATG TCTTTCCTTT TAAATGATTT	1080
ACTTTTATTT TATGTACATT TGGTGTTTTG CCTGTATGTA TGTCTGTGTG AAGGTGCCAG	1140
ATTCTCTGGA ACTGGAGTTA CAGACAGTTG TAAGCTGTCA TGTGCTTGCT GGAAATTGAA	1200
CTGCTGACCC ATCTCTTCTG CCCCCTGCGT CCTCCACCCC TTTTAGGGAC ATCCCCTACC	1260
TGAGCAAACA TAGGGCGGAC CGCATGAAGC GCTTGGGAGA CTTTCTGAAC TTGGAAAAC	1320
TTGATCTGGC TCTCCTGGAG GAGGTGAGGT TGTAGGGCAG GCTAGGTTGG AGGAGGGCAG	1380

CAGGCGGCAG GCGGCGGCAG GAAAACTTGT TCTGTCTTGG GATGAAATCC CAAGCAAGTA 1440  
TCCTCACCTT CTTCCTCCAG GTGTGGAGTG AGCAGGACTT CCAGTACCTA AGGCAAAGGC 1500  
TATCGCTCAC CTATCCAGAT GCACACTACT TCAGAAGGTG AAAAGCCTGT GTTCTCAGCC 1560  
TGTTCTCAGA CGAGGAAGCT CTCCAACATT CTTGCTTGCA CCCTCGATCT TCTTCCTCTG 1620  
GGTGTGAGAA GAGCAGGCCG TCACCCTCAT CTTGCAAGGG CTGCTGTCTT AGGCTTTGTT 1680  
CTGGGGTTGA TCTTAGCAGT AGAGCTGGGA GACCGCGGAG GGAAGAGGG CTGGCTGGGT 1740  
ACTCCCCCTC TTGCTCTTCT GGTATTAAAG CAAGAGTTGG TTTTCAGCGG GATGATAGGC 1800  
AGTGGCCTCT GTGTGTTCTC CAAACACCCA ATCCAGGAAA TCTTCAGCA TGTCTACAGT 1860  
CTGAATGGTT ACCCCTACAT GSTAAGGATC TCTTCCTAT CCTTGCTAAC ACAGACTGGA 1920  
CGCAGCCTTC CTGGGGCCTT GGCAGGAGGG TGTCAGTACC CTGAGTTTTT GTCTTCTCTT 1980  
GCCTGCAGTT CCATCATGGA GACTGGTTCT GTGGGAAGTC TGTGGGGCTG CTGGTGCTCC 2040  
GTCTAAGTGG ACTGGTGCTC AATGCCTACG TGAATCATGT GAGTGGGGCT AGCCAGGCTT 2100  
AGGCAGTGGG TCAAGCAGCC CAATGCTATG GTGGAGAAGA GACGCCACTA GTTAGTTCTG 2160  
CTGCCTGGGG ATAAGGCATG GGATCAGAAG CTAGCATTGG GCAAGGTTCA CCCATTCCCT 2220  
GTCACACTCT GCCATGTGAC AGATGACAAG CTTGATTGAG ACAGCCTTCT CTTTGATTTC 2280  
ACCTATTCCA CTTTAGCTAC ATGCTGAGTA CAGCCGACAG AAGGACATCT ACTTTGCACA 2340  
CCGTGTGGCC CAAGCTTGGG AACTGGCCCA GTTCATCCAG TGTGTGAGCC TGGGCTTGAT 2400  
GGGGGCTGTG GGGTGGGGAC GGGGTTGAGG GATGNGNAAN TTATCCTTGA AGAGGGCACA 2460  
TAATAAGGSA AGAATTTCTT CCTTGCCGCT CTTCCCCCAA CTCAGCCACA CATCCAAGAA 2520  
TGCAGATGTG GTTCTATTGT GTGGAGACCT CAATATGCAC CCCAAAGACC TGGGCTGCTG 2580  
CCTGCTGAAA GAGTGGACAG GGCTCCATGA TGCTTTCGTT GAGACTGAGG ACTTTAAGGT 2640  
GAGAGACTGT TTCCACCAA CTCCACACTT GTTCCAGTCT TCCTGTCTCT TAGCATCCTA 2700

GCCACCTGTT TCCCTAGGGC TCTGATGATG GCTGTACCAT GGTACCCAAG AACTGCTACG 2760  
TCAGCCAGCA GGACCTGGGA CCGTTTCCGT CTGGTATCCG GATTGATTAC GTGCTTTACA 2820  
AGGTCAGGCT CTTATTCCCG GTGTGCCTTC TCCAGTATCT TCCTTCCTCT GTCAGTAGCC 2880  
CACGCTTTAG TTCAGCTACA GTCTTGGGCC ACTGATGGCT AAAGAATAGA ATCCTGTCGG 2940  
CTGGTTCTCT GGGAGAATTT AAGCTTCTCC ATGTTCTTGC TCTTCCTAGG CAGTCTCTGA 3000  
GTTCCACGTC TGCTGTGAGA CTCTGAAAAC CACTACAGGC TGTGACCCTC ACAGTGACAA 3060  
GCCCTTCTCT GATCACGAGG CCTCATGGC TACTTTGTAT GTGAAGCACA GCCCCCTCA 3120  
GGAAGACCCC TGTACTGCCT GTGGTAAGCA GCATTTCTTT TGCCCCCTCT ACTTTAAGGC 3180  
AGCCCCGCCT CCATCCTGAC CCTCCCCTGC TCTACGTTCT CTCTTTTCC AGGCCCCACTG 3240  
GAAAGGTCCG ATTTGATCAG CGTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA 3300  
GCTAAAGCTC GCTGGTGGGC TGCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT 3360  
CTGGTGTTGC TGTGTGTCCT GGCTGCAGGA GAAGAGGCCA GGGAAGTGGC CATCATCCTC 3420  
TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG 3480  
GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCCAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG 3540  
GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC 3600  
AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAAACTTGC TTGACACACT CTAGTGGCTC TACCTTGTTT 3660  
CTTGCAGAGG CATGATGGGA ACTGAAGGTC AGTGGCCTTG TCACTGTGTG GCTTTAGAGC 3720  
GTTGGCCTCT CACTTGCCTT TTTTGCACAC TCCCGTCTCC TGCCAGCACA GAGCATAAAC 3780  
CCTGTTTATG GTCATAATCC TTTTATTGTA AACAAACGAAG CCTCTGACTA AGCAGTCCAG 3840  
ATGGCGGAGG TACAGCCCTT GTGATGGTGT CTTGCTTACG GGGCAGGGAG GCAGCTAACC 3900  
ATCATCTTCT AGCCCTGGGC TCCCATCTAT GCAGGCATCT CTCTGAGCCT CCGTTCCTCC 3960  
TGGAATTGGN TCAGAGCAAT CCCGCTTGGT TCACCAACCT CCAAACAGCT TCCTTAAGGA 4020

CCTGGTTTCT CAAAANGGNA AGSTNCGGGC CTCGGGTCTT CAATANGTTT TCCTAAAAAG	4080
GGANGAATGA AAANCCTTAA GGNCCAACAA GGGGAACCCT TGGNCCCAA AGGGGACCTG	4140
GGTGGTTTCC CNTTGGGGCC AAANTTATCC CAAAGGGGTC CAATTGAAGG GTTAACCCCC	4200
CAAAANNNAC CTTTTCCCC CGGAATTTCC AAAGSTTTNC CCCCCCGGC AAAANCTCCC	4260
TTGGGGNNCC NAANCCNTGG CCGGNCCTTG GTTTTCCCC CTTTCCCAAG NATTTCAAAN	4320
NTTCCCTNGG AAANCCCTT GNTTGGNAAA ACCNAATNAN GAACCANGCC AANRNTTGCC	4380
AAANAACCNNT TTGGGCAAAG GGGGNAAATT CANCAANGGG GNAATTGGGG AAACCCNTGG	4440
GTTTNCCTAA AGGGCCCNAA NANT	4464

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2852 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ACCGCGGCCG TCGCTGGAGA GTTCGAGCCG CCTAGCGCCC CTGGAGCTCC CCAACCATGA	60
AGCCCAACTT CTCCCTGCGA CTGCGGATCT TCAACCTCAA CTGCTGGTGA GTGCGTCTGC	120
GGAGTGCAGT CTGGGGGCCA CCTTCCGTTT GCACCCATGC AGCCTTCCTC CCCCTATCCC	180
GCCCCACGAT CTCAGGGTGT AGGGAAAACC CGAACCTCCA AAGTCCACAT CTGGCCCCAG	240
CGCCGGTGGT CCCAGCAGTC GCCTCCCCTG CCCCCTCTTT CCCTTCCTTA GGGGCATTCC	300
GTACTTGAGC AAGCACCAGG CCGACCGCAT GAGGCGCCTG GGAGACTTTC TGAACCAGGA	360
GAGCTTCGAC CTGGCTTTGC TGGAGGAGGT GAGATTGTGC AGCACGGTGC GGAACCCAGG	420
CTGGGAGGAG GGACAGACCG TCCCACTGGG GAAAGACCAA GCAGGCATCC TCACCGCTTC	480

CCTCAGGTGT GGAGTGAGCA GGA CTTCAG TACCTGAGAC AGAAGCTGTC ACCTACCTAC	540
CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGGTGAGAA GCCCACTGGC CTGAAGCCTG TTGTCATCCC	600
AGGAGGCTCT TGGCCCTGCC AGCCCTTCCC TATCCTGCCT GCACTCTCCA GTCTCCTCCA	660
GCCTCCTCTC CCTCTGGATG TGAGAGAAGG AGAAGGGTGA ACCAAGAAGG TCCTATGACT	720
TCAGCCCAT TTAGCTTTGT TTTCTGGCTG CCCTATACTC CTCCAAAGGC CGTCGCCTTG	780
GTTCTAGGGC TAGTCCCAGC AGTAGAAAAA GAAAAAATA GCTGATCAGA GCTGGAAGAC	840
AAGGGAGGGG AAGAAGGCTG GGTGTCTCTC CCTGTTTTTC TGGTTATTAA GCAGGGCTTG	900
GCTTTCAGCG GAATCATTGG CAGTGGCCTC TGIGTCTTCT CCAAACATCC AATCCAGGAG	960
CTTACCCAGC ACATCTACAC TCTCAATGGC TACCCCTACA TGSTAAGGCA GACCTTTGAC	1020
CTCTTCCACC TCCCTTCCCC ACCTCCAGTA ATACAAGGTA GAGGAGGCAG CCCTCTGAGA	1080
GCTGCAGGGG ATGGGCAGAA AGATGGTGGC GGTGCCCTGA GTTCTATCT CCTCCTGCCT	1140
GCAGATCCAT CATGGTGA CTGTTCACTGG GAAGGCTGTG GGGCTGCTGG TGCTCCATCT	1200
AAGTGGCATG GTGCTCAACG CCTATGTGAC CCATGTGAGT GAAGCTGGCA GTGCCTAGGG	1260
CTGGGACATG CAGCCAGTC CTGGGACAGA GAGATGGTAC TTCTCTAGCT CTCATACCTG	1320
GGGATGAGGT GTGGGGGCAA GATCTTATAA GGAAGCAATG GGCAAGGCTT ATCCATTGTA	1380
TACCAAACAC CATGCCAAGT GACAGACACA GGCTTGATTC AGACATACCC CTGGGACCCT	1440
CAGTCTTATC TGCTGTGATC TCATCCATCT TGCTCAGCTC CATGCCGAAT ACAATCGACA	1500
GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTGGC CCAAGCTTGG GAATTGGCCC AGTTCATCCA	1560
GTGTGTGAGC CTGGGCTTGA AATGGGAAGT GGGATGGGAC CCAGGGGCTG AGGGTGAACA	1620
AGGCCCCAGT CATGGGGAAG AGCTGGTGAT GGAAGAACTC CCGCCTCACC AACCTGGTTC	1680
CCCCAGCCAC ACATCCAAGA AGGCAGACGT GGTTCTGTTG TGTGGAGACC TCAACATGCA	1740
CCCAGAAGAC TGGGCTGCTG CCTGCTGAAG GAGTGGACAG GGCTTCATGA TGCCTATCTT	1800

GAAACTCGGG ACTTCAAGST GAGGACTTGC CTGTTACTTC CCCACCTATA TCCCCAGCTT 1860  
CTCTCCCTCC TTCTCCCCCA CATCCTAGCA TGAGCCAATG ATTCCCTTAG GGCTCTGAGG 1920  
AAGGCAACAC AATGGTACCC AAGAACTGNT ACGTCAGCCA GCAGGAGCTG AAGCCATTTC 1980  
CCTTTGGTGT CCGCATTGAC TACGTGCTTT ACAAGGTCAG GCTCCTCCCT TCAACATGCT 2040  
TTCATATGCT GTGTCTCTTT GTCTACTAAC CTGTGTAGAT CCTTTGCTCA GNTAGTCTAG 2100  
TCTTGACCA CTGATGGGTG GAAAGTGGG TAGCCGGGAG CTGGTTCTCT GGAAGAGGC 2160  
CCTCATATAT AAGCTTCTCT NTGGCCCTTA CTTTTCCTAG GCAGTTTCTG GGTTTTACAT 2220  
CTCCTGTAAG AGTTTTGAAA CCACIACAGG CTTTGACCCT NACAGGGGCA CCCCCCTCTC 2280  
TTGATCATGA AGCCCTGATG GCTACTCTGT TTGTGAGGCA CAGCCCCCCA CAGCAGAACC 2340  
CCAGCTCTAC CCACGGTGAG TCACCCCCAC CCTTTCCTTG GCCCTTGCCC CGCTTGAAGC 2400  
AGCCCTTCCA CTCTTGACTC TCTCCTGCCC CACTGCCCTG CTCTGTTGTA GGACCAGCAG 2460  
AGAGGTGCGC GTTGATGTGT GTGCTAAAGG AGGCCTGGAC GGAGCTGGGT CTGGGCATGG 2520  
CTCAGGCTCG CTGGTGGGCC ACCTTCGCTA GCTATGTGAT TGGCCTGGGG CTGCTTCTCC 2580  
TGGCACTGCT GTGTGTCCTG GCGGCTGGAG GAGGGGCCGG GGAAGCTGCC ATACTGCTCT 2640  
GGACCCCCAG TGTAGGGCTG GTGCTGTGGG CAGGTGCATT CTACCTCTTC CACGTACAGG 2700  
AGGTCAATGG CTTATATAGG GCCCAGGCTG AGCTCCAGCA TGTGCTAGGA AGGGCAAGGG 2760  
AGGCCCAGGA TCTGGGCCCA GAGCCTCAGC CAGCCCTACT CCTGGGGCAG CAGGAGGGGG 2820  
ACAGAACTAA AGAACAATAA AGCTTGGCCC AA 2852

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05127

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50  
A61K38/43 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document	1-3,5-7, 9,21,24
A	---	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
	---	
	--/--	



Further documents are listed in the continuation of box C



Patent family members are listed in annex

### \* Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1998

Date of mailing of the international search report

29/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 98/05127

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE. ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract	3
A	CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract	14-17
A	DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1	1-24
P,X	TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document	1-11, 20-24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Information on patient family members

PCT/EP 98/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50  
 A61K38/43 A01K67/027

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 21, 25. Juli 1989, Seiten 12554-12561, XP002087487 siehe das ganze Dokument	1-3,5-7, 9,21,24
A	---	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2. Juli 1998  siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen 1.2 siehe Ansprüche 1-30 ---	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Dezember 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag Anspruch Nr.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL.: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE. ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS"</p> <p>FASEB JOURNAL.</p> <p>Bd. 10, Nr. 6, 30. April 1996, Seite A1253</p> <p>XP000644454</p> <p>siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity."</p> <p>J. BIOL. CHEM.</p> <p>Bd. 272, Nr. 11, 14. März 1997.</p> <p>XP002087488</p> <p>siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK</p> <p>Accession No. AA412649, 18. Mai 1997</p> <p>HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST."</p> <p>XP002087490</p> <p>Vergleiche mit Aminosäuren 247-394 in Seq. ID 1</p> <p>---</p>	1-24
P.X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?"</p> <p>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.</p> <p>Bd. 95, Nr. 7, 31. März 1998, Seiten 3638-3643, XP002087489</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-11, 20-24

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 16 und 17  
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen  
Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich  
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.



